様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年　４月１０日現在

研究種目：若手研究（Ｂ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19790285
研究課題名（和文）　消化器腫瘍発生における CXCL14 および組織マクロファージの役割

研究課題名（英文）　CXCL14 and tissue macrophages in gastrointestinal tumorigenesis

研究代表者
大島　浩子　（OSHIMA HIROKO）
金沢大学・がん研究所・助教
研究者番号：80362515

研究成果の概要：
消化器がんの発生過程では胃や大腸の粘膜上皮細胞が腫瘍化することとともに、腫瘍細胞周囲にマクロファージが浸潤して活性化することが重要であると考えられていた。本研究では、腸管腫瘍発生マウスモデルでマクロファージを欠損させると腫瘍発生が抑制されることを明らかにした。さらに、マクロファージ浸潤に関与すると考えられたケモカイン CXCL14 の遺伝子ノックアウトマウスを作製して解析した結果、CXCL14 は腫瘍組織へのマクロファージ浸潤に関与していない可能性が示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
平成１９年度	1,300,000	0	1,300,000
平成２０年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：分子病理学
科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学
キーワード：胃がん、腸管腫瘍、マクロファージ、CXCL14、ケモカイン、炎症

１．研究開始当初の背景

腫瘍細胞を取り巻く微小環境が、腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが多くの研究報告から知られていた。とくに腫瘍発生初期に、プロスタグランジン合成酵素である COX-2 が間質細胞で誘導され、それによる PGE_2 の産生誘導が消化管腫瘍発生に必須であることが遺伝子改変マウスモデルを用いた研究により示されていた。そこで、胃粘膜で PGE_2 を産生するトランスジェニックマウス（*K19-C2mE*）マウスを作製して解析した結果、PGE_2 経路の誘導にともないマクロファージの胃粘膜浸潤が誘導され、その活性化により上皮細胞の増殖が亢進することを明らかにした。この結果により、浸潤したマクロファージが腫瘍発生に何らかの役割を果たしていると推察された。がん組織では、間質のマクロファージが増殖因子の産生や血管新生の亢進により腫瘍細胞増殖を促進している可能性が報告されており、以上の我々の知見もそれを支持していた。

一方、複数のケモカインがマクロファージ

遊走に関与することが知られているが、その中でも、CXCL14 が PGE_2 との相互作用によりマクロファージを遊走させる事が報告された。すなわち、CXCL14 単独ではマクロファージが走化性を示さないが、PGE_2 存在下だと CXCL14 は強いマクロファージ遊走作用を示す。*K19-C2mE* マウスの胃粘膜および、腸管腫瘍自然発生モデルである $Apc^{\Delta 716}$ マウスの腸ポリープ組織を用いた遺伝子発現解析の結果、CXCL14 の発現が有意に上昇していた事から、がん組織へのマクロファージ浸潤にも CXCL14 と PGE_2 の相互作用が関与している可能性が考えられた。

２．研究の目的

以上の研究背景および研究代表者らのこれまでの研究成果から、胃粘膜および腸管に発生する消化管腫瘍組織では、CXCL14 の作用によりマクロファージが浸潤し、腫瘍組織内のマクロファージが発がんに重要な役割を果たしていると推測された。この仮説を検証するため、本研究では（１）消化管腫瘍発生におけるマクロファージの役割について明らかにし、（２）腫瘍組織へのマクロファージ浸潤における CXCL14 の役割を明らかにすることを目的として、マウスモデルを用いた実験を実施した。これまでに消化管での発がんにおけるマクロファージの役割について、遺伝学的な解析はほとんどなされておらず、本研究により当該研究領域に重要な知見が得られることが期待された。

３．研究の方法

本研究は上記の目的を達成するために、以下の二つの実験を実施した。

（１）マクロファージ欠失による消化管腫瘍発生への影響の解析

COX-2/PGE_2 経路の誘導により、胃粘膜および腸管での腫瘍自然発生マウスモデルとして、これまでに作製した *K19-Wnt1/C2mE* マウスおよび $Apc^{\Delta 716}$ マウスを用いた。これらのモデルマウスに発生する消化管腫瘍組織にマクロファージが浸潤していることを、F4/80 抗体を用いた免疫染色により確認した後、マクロファージ欠損マウスである *op/op* マウスとの交配を行ない、*K19-C2mE*; *op/op* および $Apc^{\Delta 716}$; *op/op* マウスを作製した。これらの複合変異マウスに発生する腫瘍病変でのマクロファージ浸潤の有無を免疫染色により確認し、腫瘍病変の状況を病理学的および組織学的に解析した。

（２）CXCL14 遺伝子欠損による消化管腫瘍へのマクロファージ浸潤の影響

最初に CXCL14 遺伝子欠損マウスを以下の方法により作製した。CXCL14 遺伝子の第２エクソンの上流約 0.8kb と下流約 4.5kb の染色体 DNA を genomic PCR により増幅してサブクローニングした。それらの断片と、薬剤選択用の PGE-Neo および PGK-DT カセットを用いて遺伝子ノックアウトマウス用のターゲティングベクターを作製し、ES 細胞に電気穿孔法により導入した後に G418 による薬剤選択を施し、相同組み換えクローンを得た。この ES 細胞を用いて CXCL14 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。

次に、CXCL14 遺伝子ノックアウトマウスを *K19-C2mE* および $Apc^{\Delta 716}$ マウスと交配し、*K19-C2mE*; CXCL14 (-/-) および $Apc^{\Delta 716}$; CXCL14 (-/-)マウスを作製した。これらのマウスを 20 週齢の時に病理解剖し、マクロファージ浸潤の有無を F4/80 による免疫染色により解析した。

４．研究成果

（１）マクロファージ欠失による消化管腫瘍発生への影響の解析

K19-Wnt1/C2mE マウスの胃粘膜には、Wnt シグナルと PGE_2 経路の相互作用により腫瘍が発生する。その腫瘍組織を用いて、F4/80 抗体を用いて免疫染色を行なった結果、野生型マウスでは粘膜固有層にマクロファージが散在していたが、*K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がん組織では間質への顕著なマクロファージ浸潤が認められた（図１）。

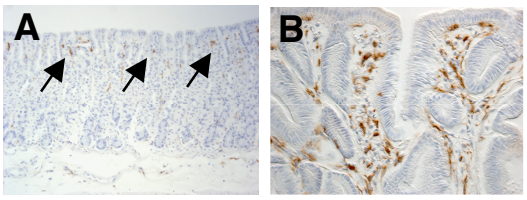

図１　F4/80 抗体を用いた免疫染色。(A)野生型マウス胃粘膜, (B)*K19-Wnt1/C2mE* マウス胃がん組織。茶色の染色がマクロファージ。

$Apc^{\Delta 716}$ マウス腸管腫瘍組織でも同様に F4/80 で検出されるマクロファージが間質に浸潤していた。

次に、腫瘍発生におけるマクロファージ浸潤の役割を解明するため、$Apc^{\Delta 716}$ マウスと *op/op* マウスを交配し、$Apc^{\Delta 716}$; *op/op* マウスを作製した。*op/op* マウスでは、Csf-1 遺伝子変異によりマクロファージの分化が抑制されている。F4/80 抗体を用いた免疫染色を行なった結果、予想通り粘膜固有層および腫瘍組織内にマクロファージは検出されなかった。重要なことに、$Apc^{\Delta 716}$; *op/op* マウスの小

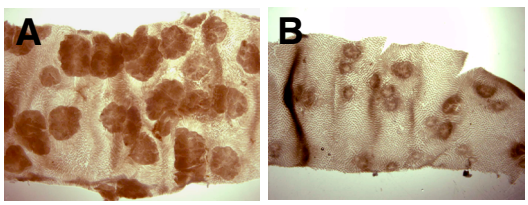

図２　$Apc^{\Delta 716}$ (A)および $Apc^{\Delta 716}$; *op/op* (B)に発生した小腸ポリープ（矢印）。マクロファージ欠損により腫瘍が小さくなっている。

腸に発生したポリープは、対照群の *Apc*$^{\Delta 716}$ マウスと比較して顕著に小さかった（図２）。発生した腸管ポリープ総数は *Apc*$^{\Delta 716}$; *op/op* で有意に減少したが、マクロファージが欠損していても平均 100 個程度の腫瘍が発生することが明らかになった（図３）。しかし、直径 1mm 以上のポリープに限定してカウントすると、*Apc*$^{\Delta 716}$ マウスに発生した数の約 20%程度まで減少し、対照群との差がより顕著となった。この結果は、腫瘍組織に浸潤したマクロファージは、腫瘍発生頻度よりも腫瘍の増殖・成長に重要であることを示している。

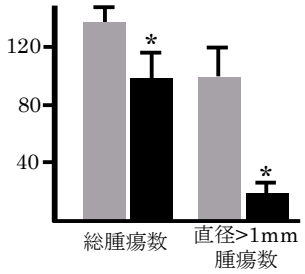

図３　*Apc*$^{\Delta 716}$ (灰色), *Apc*$^{\Delta 716}$; *op/op* (黒)各マウスに発生した腸管腫瘍総数および直径 1mm 以上の腫瘍数。
asterisks, P<0.05

一方、*K19-C2m*E; *op/op* マウスの胃粘膜には、対照群の *K19-C2mE* マウスとほぼ同じ程度のマクロファージ浸潤が認められた。この結果は、胃粘膜へのマクロファージ浸潤および分化には CSF-1 が関与していない事を示している。したがって、胃でのマクロファージ欠損実験に *op/op* マウスは適していないことが明らかとなった。

（２）CXCL14 遺伝子欠損による消化管腫瘍へのマクロファージ浸潤の影響

最初に、研究の方法に記載した方法により得た相同組み換え ES 細胞を用いて CXCL14 遺伝子ノックアウトマウスを作製した。生殖系列で CXCL14 遺伝子変異を伝達する系統を確立後、ヘテロマウスどうしの交配を行なった結果、野生型(+/+)、ヘテロ(+/-)、ホモ(-/-)の個体が 33:92:20 の割合で生まれ、ホモ個体が全体の 13.8%だった。したがって、CXCL14 遺伝子欠損は、部分的に胎性致死であることが明らかとなった。しかし、同じホモの遺伝子型の中で、生存して生まれる個体と致死となる個体が混在する理由については未だ不明である。

次に、CXCL14 ノックアウトマウスを *Apc*$^{\Delta 716}$ マウスと交配し、*Apc*$^{\Delta 716}$; CXCL14(-/-)マウスを作製した。20 週齢で病理解剖し、腸管ポリープ数を測定した結果、CXCL14 遺伝子の有無による有意差は認められなかった。さらに、腫瘍の直径を計測してサイズ別の分布を解析したが、CXCL14 遺伝子の有無による腫瘍の大きさの差は観察されなかった、この結果は、CXCL14 遺伝子の発現は腸管腫瘍発生には関与していない事を示している。

さらに、CXCL14 ノックアウトマウスを *K19-C2mE* マウスに交配して、*K19-C2mE*; CXCL14 (-/-)マウスを作製して解析した。その結果、CXCL14 欠損により *K19-C2mE* マウス胃粘膜の過形成が抑制される傾向が見られた。しかし、F4/80 による免疫染色を行なった結果、*K19-C2mE*; CXCL14 (-/-)マウス胃粘膜および粘膜下組織へのマクロファージ浸潤が認められた（図４）。以上の結果から、CXCL14 は、胃および腸管の腫瘍組織へのマクロファージ浸潤には関与していない可能性が考えられた。

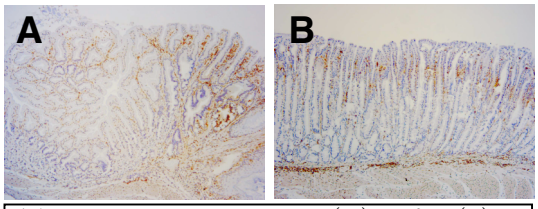

図４　*K19-C2mE*; CXCL14(-/-) マウス(A)および CXCL14 (-/-)マウス(B)胃粘膜の F4/80 抗体を用いた免疫染色。茶色：マクロファージ。

以上の研究成果により、消化管腫瘍発生には腫瘍組織へのマクロファージ浸潤が重要であることが明らかとなった。また、腫瘍組織では CXCL14 および PGE_2 の産生量が増加しているが、少なくとも CXCL14 はマクロファージ浸潤に関与していないことが明らかとなった。今後、腫瘍組織にマクロファージ浸潤を誘導させるケモカインの特定が重要な研究課題として考えられた。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 ６ 件）

① Oshima H, Itadani H, Kotani H, (他１名，１番目). Induction of prostaglandin E2 pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res* 69: 2729-2733, 2009.［査読あり］

② Howlett M, Giraud A, Lescesen H (他 11 名，12 番め). The interleukin-6 family cytokine interleukin-11 regulates homeostatic epithelial cell turnover and promotes gastric tumor development. *Gastroenterology*, 136: 967-977, 2008. ［査読あり］

③ Oguma K*, Oshima H*, Aoki M, (他７名，２番目，*共同筆頭著者). Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor-α in gastric tumor cell. *EMBO J* 27: 1671-1681, 2008. ［査読あり］

④ Guo X, Oshima H, Kitamura T, (他２名, ２番目). Stromal fiboblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer. *J Biol Chem* 283: 19864-19871, 2008. ［査読あり］

⑤ Piao YS, Du YC, Oshima H, (他４名, ３番目). Platelet 12-lipoxigenase accelerates tumor promotion of mouse epidermal cells through enhancement of cloning efficiency. *Carcinogenesis* 29: 440-447, 2008. ［査読あり］

⑥ Oshima M, Suzuki H, Guo X, Oshima H（４番目）. Increased level of serum vascular endothelial growth factor by long-term exposure to hypergravity. *Exp Anim* 56: 309-313, 2007. ［査読あり］

〔学会発表〕（計 10 件）

① Oshima H, Oguma K, Kotani H, (他１名, １番目). Gastric tumorigenesis through EGFR activation in Wnt and PGE_2 transgenic mice. *67th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Nagoya) Oct, 28, 2008. ［日本癌学会学術総会］

② Oguma K, Oshima H, Aoki M, (他７名. ２番目). Promotion of Wnt signaling by activated macrophage-derived TNF-α. *67th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Nagoya) Oct, 2008. ［日本癌学会学術総会］

③ Oshima H, Oshma M. Gastric carcinogenesis: Lessons from mouse models of gastric cancer. *2nd Asan International Digestive Disease Symposium*, (Seoul) July 5, 2008.

④ Oshima M, Oshima H, Oguma K, (他２名, ２番目) Inflammatory responses accelerate Wnt signaling in gastric epithelial cells. *99th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR)*, (San Diego) Apr 15, 2008.

⑤ Oshima H, Taketo MM, Oshima M. Novel gastric cancer mouse model by transgenic expression of Wnt1 and prostaglandin E_2: *12th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, Sapporo, Dec 22, 2007.

⑥ 朴　英実, 杜宇琛, 大島浩子, (他４名, ３番目)「皮膚表皮 JB6P+細胞の形質転換における 12-リポキシゲナーゼの促進作用」第 30 回日本分子生物学会第 80 回日本生化学会合同大会（横浜：2007 年 12 月 14 日）

⑦ 小熊圭祐, 大島浩子, 仲　一仁, (他２名, ２番目)「活性化マクロファージによる Wnt シグナルの亢進」第 66 回日本癌学会学術総会（横浜：2007 年 10 月 4 日）

⑧ 大島正伸, 大島浩子, 武藤　誠「Wnt シグナルと PGE_2 経路の活性化による胃がん発生モデルマウス」第 66 回日本癌学会学術総会（横浜：2007 年 10 月 4 日）

⑨ Oshima M, Oshima H and Taketo MM. Mouse model of gastric cancer by simultaneous activation of Wnt and PGE_2 pathways. *Annual Meeting of American Association for Cancer Research* (*AACR*), Los Angeles, Apr 18, 2007

⑩ Oshima H. Novel gastric cancer mouse model by transgenic expression of Wnt1 and PGE_2: *International symposium on tumor biology in Kanazawa*, Kanazawa, Jan 24, 2008.

〔図書〕（計 1 件）

Oshima M, Oshima H, Taketo MM. Prostaglandin and transforming growth factor-β signaling in gastric cancer. In *The Biology of Gastric Cancers*, Eds. by Wang TC. *et al.* Springer, pp513-540 , 2008.

６．研究組織

(1)研究代表者

大島　浩子（OSHIMA HIROKO）

金沢大学・がん研究所・助教

研究者番号：80362515

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし